

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
23. Mai 2002 (23.05.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 02/40512 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C07K 14/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/13174

(22) Internationales Anmeldedatum:  
14. November 2001 (14.11.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
100 56 365.1 14. November 2000 (14.11.2000) DE  
101 16 220.0 30. März 2001 (30.03.2001) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme  
von US): IPF PHARMACEUTICALS GMBH [DE/DE];  
Feodor-Lynen-Strasse 31, 30625 Hannover (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): FORSSMANN,  
Wolf-Georg [DE/DE]; Blücherstrasse 5, 30175 Han-  
nover (DE). KLÜVER, Enno [DE/DE]; Königsberger  
Ring 16, 30559 Hannover (DE). CONEJO-GARCIA,  
Jose-Ramon [ES/DE]; IPF Pharmaceuticals GmbH,  
Feodor-Lynen-Strasse 31, 30625 Hannover (DE). ADER-  
MANN, Knut [DE/DE]; Schleidenstrasse 5, 30177  
Hannover (DE). BALS, Robert [DE/DE]; IPF Pharmaceu-  
ticals GmbH, Feodor-Lynen-Strasse 31, 30625 Hannover  
(DE). MÄGERT, Hans-Jürgen [DE/DE]; Moltkeplatz 8,  
30163 Hannover (DE).

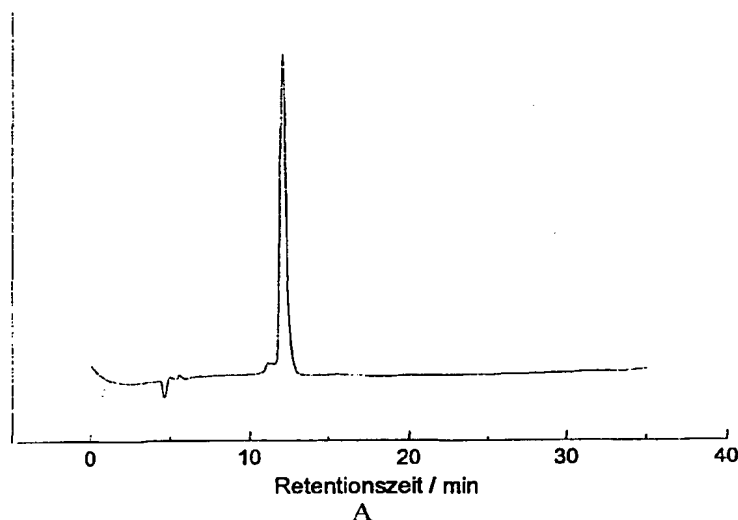
(74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Kreisler Selt-  
ing Werner, Bahnhofsvorplatz 1, 50667 Köln (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: HUMAN BETA-DEFENSIN-3

(54) Bezeichnung: HUMANES BETA-DEFENSIN-3



A...RETENTION TIME/MIN

(57) Abstract: The invention relates to a peptide, hBD-3 (human beta-defensin-3) and to derivatives and fragments thereof, in addition to a method for producing the same. The inventive peptides can be made available as medicaments and can be used to resist and combat pathogenic germs. They are particularly useful for treating bacterial diseases of the respiratory system, in particular for infections caused by *Burkholderia cepacia* and *Pseudomonas aeruginosa* and for treating cystic fibrosis. The inventive peptides can also be used to treat inflammatory diseases of the gastro-intestinal tract, urogenital tract and to treat septicemia.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 02/40512 A2

A7 - 10/091,166



CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

- (84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft ein Peptid, das hBD-3 (humanes beta-Defensin-3) und seine Derivate und Fragmente, sowie Verfahren zu ihrer Herstellung. Die erfindungsgemäße Peptide können als Arzneimittel bereitgestellt werden und zur Abwehr und Bekämpfung von pathogenen Keimen verwendet werden. Sie eignen sich besonders zur Behandlung von bakteriellen Erkrankungen der Atemwege, insbesondere bei Infektionen durch *Burkholderia cepacia* und *Pseudomonas aeruginosa* und bei der cystischen Fibrose. Auch bei entzündlichen Erkrankungen des Magen-Darm-Traktes, des Urogenitaltraktes sowie bei Sepsis sind die erfindungsgemäßen Peptide anwendbar.



### **Humanes beta-Defensin-3**

Die Erfindung betrifft ein Peptid, das hBD-3 (humanes beta-Defensin-3) und seine Derivate und Fragmente sowie Verfahren zu ihrer Herstellung. Die erfindungsgemäße Peptide können als Arzneimittel bereitgestellt werden und zur Abwehr und Bekämpfung von pathogenen Keimen verwendet werden.

Die Zahl der bekannten Wirkstoffe zur Behandlung von pathogenen Keimen ist begrenzt. Dies ist in hohem Maße problematisch, da auf der einen Seite pathogene Keime zunehmend Resistenzen gegen Antibiotika ausbilden, während andererseits nur noch selten neue antibiotische Wirkstoffe entwickelt werden. Daher sind bereits die ersten Fälle von Erregern bekannt, die sich mit keinem der bekannten antibiotischen Wirkstoffe behandeln lassen.

Die der Erfindung zugrunde liegende Aufgabe ist es, Peptide mit besonderen physiologischen Wirkungen bereitzustellen, die in hohem Maße therapeutisch wirksam sind und die auf relativ einfache Art zugänglich sind. Die Peptide sollen insbesondere wirksam sein gegen pathogene Keime, die gegen bekannte Antibiotika Resistenzen ausgebildet haben. Die erfindungsgemäßen antibiotischen Peptide sollten außerdem gut verträglich sein und eine einfache Applikation ermöglichen.

Überraschenderweise wird die erfindungsgemäße Aufgabe gelöst durch den antibiotisch wirkenden Eiweißstoff humanes beta-Defensin-3 (hBD-3, auch bezeichnet als hBD-5) mit der Aminosäuresequenz Seq. No. 1:



- 2 -

Z<sub>1</sub>-Cys-Arg-Val-Arg-Gly-Gly-Arg-Cys-Ala-Val-Leu-Ser-Cys-Leu-Pro-Lys-Glu-Glu-Gln-Ile-Gly-Lys-Cys-Ser-Thr-Arg-Gly-Arg-Lys-Cys-Cys-X<sub>1</sub>,

wobei Z<sub>1</sub> und X<sub>1</sub> Aminosäuren oder Polypeptide aus 1 bis 50 Aminosäuren darstellen, sowie deren natürliche, synthetische und pharmakologisch verträgliche Derivate, insbesondere amidierte, acylierte, phosphorylierte, glycosylierte und zyklische Derivate, sowie deren durch Aminosäuresubstitution, -deletion oder -insertion entstandene Derivate und Fragmente mit biologischer Wirkung, die aus der Aminosäuresequenz abgeleitet werden.

Erfindungsgemäß bevorzugt sind hBD-3 mit der Seq. No. 2:

Leu-Gln-Lys-Tyr-Tyr-Cys-Arg-Val-Arg-Gly-Gly-Arg-Cys-Ala-Val-Leu-Ser-Cys-Leu-Pro-Lys-Glu-Glu-Gln-Ile-Gly-Lys-Cys-Ser-Thr-Arg-Gly-Arg-Lys-Cys-Cys-Arg-Arg-Lys-Lys,

Seq. No. 3:

Gly-Ile-Ile-Asn-Thr-Leu-Gln-Lys-Tyr-Tyr-Cys-Arg-Val-Arg-Gly-Gly-Arg-Cys-Ala-Val-Leu-Ser-Cys-Leu-Pro-Lys-Glu-Glu-Gln-Ile-Gly-Lys-Cys-Ser-Thr-Arg-Gly-Arg-Lys-Cys-Cys-Arg-Arg-Lys-Lys

oder Seq. No. 4:

Met-Arg-Ile-His-Tyr-Leu-Leu-Phe-Ala-Leu-Leu-Phe-Leu-Phe-Leu-Val-Pro-Val-Pro-Gly-His-Gly-Gly-Ile-Ile-Asn-Thr-Leu-Gln-Lys-Tyr-Tyr-Cys-Arg-Val-Arg-Gly-Gly-Arg-Cys-Ala-Val-Leu-Ser-Cys-Leu-Pro-Lys-Glu-Glu-Gln-Ile-Gly-Lys-Cys-Ser-Thr-Arg-Gly-Arg-Lys-Cys-Cys-Arg-Arg-Lys-Lys.

Gegenstand der Erfindung sind auch Fragmente des hBD-3 der Aminosäuresequenz Seq. No. 5:

Z<sub>1</sub>-Cys-Arg-Val-Arg-Gly-Gly-Arg-Cys-X<sub>2</sub>

oder Seq. No. 6:

Z<sub>2</sub>-Cys-Leu-Pro-Lys-Glu-Glu-Gln-Ile-Gly-Lys-Cys-Ser-Thr-Arg-Gly-Arg-Lys-Cys-Cys-X<sub>1</sub>,



- 3 -

wobei  $Z_1$ ,  $Z_2$ ,  $X_1$  und  $X_2$  Aminosäuren oder Polypeptide aus 1 bis 50 Aminosäuren darstellen, sowie deren synthetische und pharmakologisch verträgliche Derivate, insbesondere zyklische, amidierte, acylierte, phosphorylierte und glycosylierte Derivate, sowie deren durch Aminosäuresubstitution, -deletion oder -insertion entstandene Derivate und Fragmente mit biologischer Wirkung, die aus der Aminosäuresequenz abgeleitet werden.

hBD-3-Fragmente der Erfindung sind bevorzugt solche der Sequenz Seq. No. 7:

Leu-Gln-Lys-Tyr-Tyr-Cys-Arg-Val-Arg-Gly-Gly-Arg-Cys-Ala-Val-Leu-Ser,

Seq. No. 8:

Gly-Ile-Ile-Asn-Thr-Leu-Gln-Lys-Tyr-Tyr-Cys-Arg-Val-Arg-Gly-Gly-Arg-Cys-Ala-Val-Leu-Ser

oder Seq. No. 9:

Ala-Val-Leu-Ser-Cys-Leu-Pro-Lys-Glu-Glu-Gln-Ile-Gly-Lys-Cys-Ser-Thr-Arg-Gly-Arg-Lys-Cys-Cys-Arg-Arg-Lys-Lys.

Gegenstand der Erfindung sind auch Derivate von hBD-3 oder Fragmenten von hBD-3, bei denen einzelne Aminosäuren so ausgetauscht wurden, dass das Peptid insgesamt eine höhere positive Ladung aufweist. Bevorzugt sind insbesondere Derivate, bei denen eines der vier Glycine aus Sequenz No. 1 und/oder das Alanin, das in Sequenz No. 1 auf Cystein 2 folgt und/oder das Leucin oder Prolin, die in der Sequenz No. 1 auf Cystein 3 folgen gegen basische Aminosäuren substituiert sind. Die bezeichneten sieben Aminosäuren können erfindungsgemäß auch gegen aromatische Aminosäuren ausgetauscht sein. Gegenstand der Erfindung sind analog Derivate der Peptide mit den Sequenzen 2 bis 9, bei denen das zur Sequenz 1 homologe Glycin, Alanin, Leucin und/oder Prolin ausgetauscht wurde(n).

Überraschenderweise konnte festgestellt werden, dass biologische Aktivität auch bei einer Verbrückung der Cysteine 1 und 2 vorliegt, wobei Cysteine 3 und 4 mit Cysteinen 5 und 6 über je eine Disulfidbindung verbunden sind. Dies



- 4 -

steht im Gegensatz zu früheren Darstellungen bisher bekannter Defensine [Selsted & Harwig, Journal of Biological Chemistry 264 (1989) 4003-4007; Tang & Selsted, Journal of Biological Chemistry 268 (1993) 6649-6653]. Die erfindungsgemäßen hBD-3 oder hBD-3-Fragmente oder Derivate sind in der Lage, Cysteinbrücken zwischen den sechs Cysteinen in Sequenz No. 1 auszubilden. In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Bildung der Cysteinbrücken zwischen Cystein 1 und Cystein 2, Cystein 3 und Cystein 6 und/oder Cystein 4 und Cystein 5. Die Nummern 1 bis 6 entsprechen dabei den sechs Cysteinen, die in der Sequenz No. 1 vom N- zum C- Terminus hin enthalten sind. Bei Fragmenten oder bei hBD-3, die zum Beispiel N-terminal zusätzliches Cystein beinhalten, bleiben die Nummern 1 bis 6 unverändert und bezeichnen die Cysteine, die zu denen in Sequenz 1 homolog sind. So enthält zum Beispiel das Fragment der Sequenz No. 9 die Cysteine 3 bis 6, da der Abschnitt fehlt, der die Cysteine 1 und 2 enthält. Zur einfacheren Identifizierung sind die Cysteine in den angegebenen Sequenzen kursiv aufgeführt.

Bevorzugte Peptide der Erfindung sind insbesondere Fragmente der Sequenz 6, bei denen

- Cystein 3 und Cystein 6 keine Cysteinbrücken ausbilden und Cystein 4 und Cystein 5 eine Cysteinbrücke ausbilden, oder
- Cystein 3 und Cystein 6 eine Cysteinbrücke ausbilden und Cystein 4 und Cystein 5 keine Cysteinbrücke ausbilden, oder
- keine Cysteinbrücke ausgebildet ist, oder
- Cystein 3 und Cystein 6 eine Cysteinbrücke ausbilden und Cystein 4 und Cystein 5 eine Cysteinbrücke ausbilden.

Bevorzugte Peptide der Erfindung sind auch hBD-3 oder Derivate von hBD-3, bei denen die Cysteine 3 bis 6 nach einer der vier oben aufgeführten Möglichkeiten verknüpft/nicht verknüpft sind. Dabei können Cystein 1 und Cystein 2 über eine Cysteinbrücke verbunden sein oder keine Cysteinbrücke ausbilden.



- 5 -

Die erfindungsgemäßen Eiweißstoffe können durch chemische Synthese, durch gentechnologische Produktion oder durch Isolierung aus natürlichen Quellen gewonnen werden.

Gegenstand der Erfindung ist insbesondere ein Verfahren zur Herstellung von hBD-3 oder Derivaten oder Fragmenten von hBD-3, wobei das hBD-3 oder hBD-3-Fragmente oder Derivate durch Festphasen- und/oder Flüssigphasen-Synthese aus den geschützten Aminosäuren, die in ihr enthalten sind, hergestellt werden, deblockiert werden, und durch Chromatographie aufgereinigt werden.

Erfindungsgemäß können Cysteinbrücken durch Oxidation eingeführt werden. Die Einführung kann gezielte an bestimmten Positionen erfolgen, indem die Reaktion von nicht zu verknüpfenden Cysteinen durch geeignete Schutzgruppen verhindert wird.

In einem weiteren erfindungsgemäßen Verfahren erfolgt die Herstellung von hBD-3 oder Derivaten oder Fragmenten von hBD-3 durch Expression in prokaryontischen oder eukaryontischen Zellen und anschließende chromatographische Reinigung unter Verwendung bekannter Methoden. Hierfür stehen verschiedene Expressionsvektoren zur sekretorischen oder direkten cytoplasmatischen Expression zur Verfügung.

Das erfindungsgemäße hBD-3 oder Derivate oder Fragmente können aus Körperflüssigkeiten, vorzugsweise aus menschlichem Blut, Hemofiltrat oder Hemodialysat über Chromatographie-Verfahren isoliert werden. Hemofiltrat oder Hemodialysat kann aus menschlichem Blut abfiltriert werden. Dies ist besonders vorteilhaft, da Hemofiltrat bislang als wertlos angesehen und verworfen wurde. So erschließt sich auf einfache Art eine Quelle für die wirtschaftliche Verwertung.

Gegenstand der Erfindung sind auch Nucleinsäuren, kodierend für hBD-3 oder seine Derivate oder Fragmente, insbesondere DNS und RNS. Die Erfindung betrifft auch Vektoren oder Plasmide, die solche Nucleinsäuren enthalten und Fragmente, die sich als Antisense-Nucleotide eignen, insbesondere zu



- 6 -

kodierenden Nucleinsäuren komplementäre Fragmente mit einer Länge von 12-26 Nucleotiden.

Gegenstand der Erfindung ist auch ein Arzneimittel, enthaltend hBD-3 oder Derivate oder Fragmente von hBD-3, oder Nucleinsäuren, die für hBD-3 kodieren und Vektoren oder Plasmide, die solche Nucleinsäuren enthalten.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung von hBD-3 oder Derivaten oder Fragmenten von hBD-3 zur Herstellung eines Arzneimittels zur antimikrobiellen Behandlung, zur Abwehr und Bekämpfung von pathogenen Keimen, zur Behandlung von Erkrankungen der Atemwege, insbesondere die durch Infektionen mit den Bakterien *Burkholderia cepacia* und *Pseudomonas aeruginosa* ausgelöst oder verstärkt werden, zur Behandlung der cystischen Fibrose, zur Behandlung entzündlicher Krankheiten des Magen-Darm-Traktes, des Urogenitaltraktes, bei Sepsis, bei gastrointestinalen Infektionen, insbesondere durch *Helicobacter pylori* ausgelöst, zur Behandlung und Abwehr von gram-positiven und gram-negativen Bakterien, Hefen, *Helicobacter pylori*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* oder *Burkholderia cepacia*. Dabei können in weiteren Ausführungsformen auch Nucleinsäuren, die für hBD-3, Derivate oder Fragmente kodieren, sowie Vektoren oder Plasmide, die solche Nucleinsäuren enthalten, eingesetzt werden, zum Beispiel im Zusammenhang mit einer Gentherapie. Die Nucleinsäuren können vorzugsweise auch als Antisense-Oligonucleotide eingesetzt werden.

Die erfindungsgemäßen Eiweißstoffe sind insbesondere in der Lage, die bakterielle Invasion bei Entzündungserkrankungen der Atemwege einzuschränken oder zu verhindern. Insbesondere weil die erfindungsgemäßen Peptide Analoga körpereigener Substanzen sind, weisen sie eine hohe Verträglichkeit für den Organismus auf. Das erfindungsgemäße Peptid hBD-3 und seine Derivate und Fragmente sind besonders auch für die Langzeittherapie bei Infektionserkrankungen der Atemwege durch pathogene Keime, insbesondere *Burkholderia cepacia* und *Pseudomonas aeruginosa*,



- 7 -

geeignet, da sie über eine ausgezeichnete biologische Wirksamkeit verfügen und andererseits auch bei Dauerbehandlung keine Immunreaktion auslösen.

Überraschenderweise eignen sich hBD-3, seine Derivate und Fragmente auch zur Einleitung der Apoptose und daher zur Behandlung maligner Melanome und anderer Tumore, wie Tumore des gastrointestinalen Bereichs.

Im Gegensatz zur Nekrose erfüllt die Apoptose als programmierter Zelltod eine wichtige Funktion bei unterschiedlichsten biologischen Vorgängen, welche die gezielte Eliminierung unerwünschter oder überflüssiger Zellen erfordern. Als Beispiele seien die Beseitigung nicht benötigter Zellen bei Entwicklungs- und Differenzierungsvorgängen, die Abtötung von Zellen im Rahmen von Immunreaktionen und die Vernichtung geschädigter Zellen genannt. Für die Therapie von Tumoren macht man sich die gezielte Herbeiführung der Apoptose mit Hilfe bestimmter Chemotherapeutika zunutze.

Das Protein p53 nimmt bei der Einleitung apoptotischer Prozesse eine Schlüsselfunktion ein. Es wird in noch nicht vollständig geklärter Weise durch geschädigte Desoxyribonucleinsäure (DNA) und andere in Zusammenhang mit zellulärem Stress vermittelte Signale aktiviert. Wahrscheinlich unter Beteiligung des Faktors Bax stimuliert aktiviertes p53 die Freisetzung von Cytochrom C aus Mitochondrien. Cytochrom C triggert die Oligomerisierung des Faktors Apaf-1, der daraufhin an Procaspase-9 bindet und diese aktiviert, was unweigerlich zum Zelltod führt (Jones, P.A., Nature 409: 141, 2001).

Mutationen im Gen für p53 kommen in der Tat bei vielen aggressiven und chemoresistenten Tumoren vor und gehen meist mit einer schlechten Prognose für den Patienten und unwirksamer Chemotherapie einher. In den ebenfalls aggressiven und chemoresistenten Melanomen werden Mutationen im p53-Gen hingegen nur selten beobachtet. Hier kann p53 durch Chemotherapeutika normal hochreguliert werden, was jedoch keine Apoptose nach sich zieht. Es wurde gezeigt, dass dieser Defekt in der apoptotischen Signalkaskade auf einer Ausschaltung des Apoptose-Effektors Apaf-1 beruht, die auf die Methylierung einer Enhancer-Region des Gens und damit auf eine Repression der Transkription zurückzuführen ist (Soengas *et al.*, Nature 409:



- 8 -

207, 2001). Die Möglichkeit einer Hochregulation von Apaf-1 ist daher ein wichtiger Schritt für die Behandlung maligner Melanome und anderer Tumore.

Die bei der Substanzklasse der Defensine bislang nicht beobachtete Disulfidverbrückung Cys1-Cys2; Cys3-Cys6; Cys4-Cys5 eröffnete die Möglichkeit, die oben bezeichneten biologisch aktiven Fragmente des Peptids zu synthetisieren, ohne dabei weitere Veränderungen am Molekül vornehmen zu müssen. Es handelt sich dabei um kürzere N-terminale Fragmente, die die Disulfidbrücke Cys1-Cys2 enthalten, sowie um längere C-terminale Fragmente, die die beiden übrigen Disulfidbrücken beinhalten.

Die Verwendung von hBD-3 oder Derivaten und Fragmenten erfolgt dabei vorzugsweise in geeigneten galenischen Applikationsformen, insbesondere lyophilisiert und in Mannit aufgenommen in sterilen Ampullen zur Auflösung in Kochsalzlösung und/oder Infusionslösungen und Inhalationslösungen, und/oder in Kombination mit anderen antibiotischen Wirkstoffen. Natürlich können auch Gemische verschiedener erfindungsgemäßer Wirkstoffe eingesetzt werden. Die Peptide können als hochreiner Stoff oder - wenn für die bestimmte Verwendung ausreichend - innerhalb eines teilweise aufgereinigten Peptidgemisches verwendet werden.

Die Arzneimittelzubereitung enthält das erfindungsgemäße Peptid oder ein physiologisch verträgliches Salz. Die Form und Zusammensetzung des Arzneimittels, welches das Peptid enthält, richtet sich nach der Art der Verabreichung. Das Peptid kann parenteral, intranasal, oral und mittels Inhalation verabreicht werden. Vorzugsweise werden hBD-3 oder seine Derivate oder Fragmente entweder als Lösung oder als Lyophilisat zur Auflösung unmittelbar vor Gebrauch, konfektioniert. Die Arzneimittelzubereitung kann außerdem Hilfsstoffe enthalten, die abfülltechnisch bedingt sind, einen Beitrag zur Löslichkeit, Stabilität oder Sterilität des Arzneimittels leisten oder den Wirkungsgrad der Aufnahme in den Körper erhöhen.



**Ausführungsbeispiele:****Synthese des humanen Defensins hBD-3:**

Für die Synthese des Peptids mit der Formel

Leu-Gln-Lys-Tyr-Tyr-Cys-Arg-Val-Arg-Gly-Gly-Arg-Cys-Ala-Val-Leu-Ser-Cys-  
Leu-Pro-Lys-Glu-Glu-Gln-Ile-Gly-Lys-Cys-Ser-Thr-Arg-Gly-Arg-Lys-Cys-Cys-  
Arg-Arg-Lys-Lys

wurde die Festphasenmethode (Chan and White, Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis. Oxford University Press, 2000) angewendet. Die genannte Peptidsequenz wurde an einem mit Lysin vorbeladenen Trägerharz mit Hilfe einer automatischen Peptidsynthese-Apparatur (ABI 433A) unter Verwendung der *in situ* durch Zugabe von HBTU [2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-Hexafluorophosphat] gebildeten Hydroxy-Benzotriazol-Ester synthetisiert. Verwendet wurden folgende Derivate der L-Aminosäuren im Überschuss (10 Äquivalente):

Fmoc-Ala	Fmoc-Leu
Fmoc-Arg(Pbf)	Fmoc-Lys(Boc)
Fmoc-Cys(Trt)	Fmoc-Pro
Fmoc-Gln(Trt)	Fmoc-Ser(tBu)
Fmoc-Glu(OtBu)	Fmoc-Thr(tBu)
Fmoc-Gly	Fmoc-Tyr(tBu)
Fmoc-Ile	Fmoc-Val

Das Peptid wurde vom Trägerharz durch Zugabe einer Mischung von Trifluoressigsäure-Ethandithiol-Wasser 94 : 3 : 3 (v/v/v) abgespalten und mit tert-Butylmethylether gefällt. Zur Einführung der drei intramolekularen Disulfidbrücken wurde das per HPLC vorgereinigte Peptid mit Hilfe von Dimethylsulfoxid (DMSO, 20 %) bei pH 6 oxidiert. Aus der inhomogenen Produktmischung wurde das Hauptprodukt mittels HPLC isoliert und mit Hilfe von analytischer HPLC, massenspektrometrischer Analyse,



- 10 -

Kapillarzonenoelektrophorese und Aminosäuresequenzanalyse charakterisiert (Fig. 1-3).

Alternativ kann die Einführung der Disulfidbrücken selektiv vorgenommen werden durch Verwendung zweier Fmoc-Cys(Acm)-Derivate während der Synthese und Verknüpfung der entsprechenden Cysteine mittels Iod nach Einführung der anderen beiden Disulfidbrücken.

Die Charakterisierung des synthetisierten Peptids beinhaltet den Nachweis der intramolekularen Disulfidverknüpfung nach folgender Vorgehensweise. hBD-3 wurde durch gleichzeitige Einwirkung von Trypsin und Chymotrypsin proteolytisch zerlegt. Dabei bleiben die Disulfidbrücken intakt, und eine Analyse der miteinander verknüpften cysteinhaltigen Fragmente erlaubt die Ableitung des ursprünglichen Verknüpfungsmusters. Die erhaltenen Peptidfragmente wurden per HPLC isoliert und sowohl massenspektrometrisch als auch mit Hilfe von Aminosäuresequenzanalyse identifiziert (Fig.4, Tab.1). Die Sequenzanalyse ermöglichte zudem eine eindeutige Zuordnung der Disulfidverbrückung an den beiden benachbarten Cysteinen, einer Konstellation, die im Allgemeinen besondere analytische Schwierigkeiten bereitet.

Die bei der Substanzklasse der Defensine bislang nicht beobachtete Disulfidverbrückung Cys1-Cys2; Cys3-Cys6; Cys4-Cys5 eröffnete die Möglichkeit, zwei Teilstücke des Peptids getrennt zu synthetisieren, ohne dabei weitere Veränderungen am Molekül vornehmen zu müssen. Es handelt sich dabei um ein kürzeres N-terminales Fragment, das die Disulfidbrücke Cys1-Cys2 enthält, sowie um ein längeres C-terminales Fragment, das die beiden übrigen Disulfidbrücken beinhaltet. Die Synthese und folgende Untersuchung dieser beiden Fragmente dient der Zuordnung biologischer Wirkungen des Peptids hBD-3 zu bestimmten Molekülregionen.

#### Synthese des Peptids hBD-3 (1-17):

Für die Synthese des Peptids mit der Formel

Leu-Gln-Lys-Tyr-Tyr-Cys-Arg-Val-Arg-Gly-Gly-Arg-Cys-Ala-Val-Leu-Ser



- 11 -

wurde die Festphasenmethode (Chan and White, Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis. Oxford University Press, 2000) angewendet. Die genannte Peptidsequenz wurde an einem mit Serin vorbeladenen Trägerharz mit Hilfe einer automatischen Peptidsynthese-Apparatur (ABI 433A) unter Verwendung der *in situ* durch Zugabe von HBTU [2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-Hexafluorophosphat] gebildeten Hydroxy-Benzotriazol-Ester synthetisiert. Verwendet wurden folgende Derivate der L-Aminosäuren im Überschuss (10 Äquivalente):

Fmoc-Ala	Fmoc-Leu
Fmoc-Arg(Pbf)	Fmoc-Lys(Boc)
Fmoc-Cys(Trt)	Fmoc-Tyr(tBu)
Fmoc-Gln(Trt)	Fmoc-Val
Fmoc-Gly	

Das Peptid wurde vom Trägerharz durch Zugabe einer Mischung von Trifluoressigsäure-Ethandithiol-Wasser 94 : 3 : 3 (v/v/v) abgespalten und mit tert-Butylmethylether gefällt.

Zur Einführung der Disulfidbrücke wurde das per HPLC vorgereinigte Peptid mit Hilfe von Dimethylsulfoxid (DMSO, 20 %) bei pH 6 oxidiert. Das Reaktionsprodukt wurde mittels HPLC gereinigt und mit Hilfe von analytischer HPLC, massenspektrometrischer Analyse, Kapillarzonenoelektrophorese und Aminosäuresequenzanalyse charakterisiert (Fig. 5-7).

Die Disulfidbrücke kann alternativ durch Oxidation mit Luftsauerstoff im basischen pH-Bereich eingeführt werden, wobei als Nebenprodukte jedoch Dimere entstehen.

#### Synthese des Peptids hBD-3 (14-40) [Cys18-36/Cys28-35]:

Für die Synthese des Peptids mit der Formel

Ala-Val-Leu-Ser-Cys-Leu-Pro-Lys-Glu-Glu-Gln-Ile-Gly-Lys-Cys-Ser-Thr-Arg-  
Gly-Arg-Lys-Cys-Cys-Arg-Arg-Lys-Lys



- 12 -

wurde die Festphasenmethode (Chan and White, Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis. Oxford University Press, 2000) angewendet. Die genannte Peptidsequenz wurde an einem mit Lysin vorbeladenen Trägerharz mit Hilfe einer automatischen Peptidsynthese-Apparatur (ABI 433A) unter Verwendung der *in situ* durch Zugabe von HBTU [2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-Hexafluorophosphat] gebildeten Hydroxy-Benzotriazol-Ester synthetisiert. Verwendet wurden folgende Derivate der L-Aminosäuren im Überschuss (10 Äquivalente):

Fmoc-Ala	Fmoc-Ile
Fmoc-Arg(Pbf)	Fmoc-Leu
Fmoc-Cys(Trt)	Fmoc-Lys(Boc)
Fmoc-Cys(Acm)	Fmoc-Pro
Fmoc-Gln(Trt)	Fmoc-Ser(tBu)
Fmoc-Glu(OtBu)	Fmoc-Thr(tBu)
Fmoc-Gly	Fmoc-Val

Das Peptid wurde vom Trägerharz durch Zugabe einer Mischung von Trifluoressigsäure-Ethandithiol-Wasser 94 : 3 : 3 (v/v/v) abgespalten und mit tert-Butylmethylether gefällt.

Das Peptid verlangt eine selektive Einführung der zwei Disulfidbrücken. Eine simultane Oxidation mit Luftsauerstoff oder DMSO liefert ein Gemisch von zwei Faltungsisomeren zu gleichen Anteilen. Daher wurden bei der Peptidsynthese zwei der vier Cysteine (Cys18 und Cys36) als Fmoc-Cys(Acm)-Derivate eingesetzt, die beiden übrigen als Fmoc-Cys(Trt)-Derivate.

Zur Bildung der ersten Disulfidbrücke wurde das per HPLC vorgereinigte Peptid mit Hilfe von Dimethylsulfoxid (DMSO, 20 %) bei pH 6 oxidiert. Das Reaktionsprodukt wurde über HPLC gereinigt und nachfolgend mit Iod im sauren pH-Bereich oxidiert. Das vollständig oxidierte Endprodukt wurde mittels HPLC gereinigt und mit Hilfe von analytischer HPLC, massenspektrometrischer Analyse, Kapillarzonenoelektrophorese und Aminosäuresequenzanalyse charakterisiert (Fig. 8-10).



- 13 -

Das synthetische Peptid hBD-3 (14-40) [Cys18-36/Cys28-35] mit bekannter, weil synthesebedingt vorgegebener Cysteinverknüpfung lieferte eine weitere Möglichkeit zur Verifizierung der ermittelten Disulfidverbrückung von hBD-3. Die proteolytische Zerlegung von hBD-3 mit Chymotrypsin (pH 8) führte zu dem C-terminalen Peptidfragment Ser-Cys-Leu-Pro-Lys-Glu-Glu-Gln-Ile-Gly-Lys-Cys-Ser-Thr-Arg-Gly-Arg-Lys-Cys-Cys-Arg-Arg-Lys-Lys. Dasselbe Fragment wurde erhalten durch analoge Proteolyse von hBD-3 (14-40) [Cys18-36/Cys28-35]. Die Identität der beiden Fragmente, und damit identische Disulfidverbrückung, konnte durch Komigration bei der Kapillarzonenoelektrophorese gezeigt werden (Fig. 11).



**Tabelle 1**

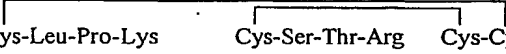
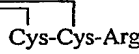
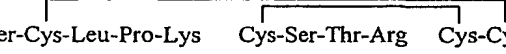
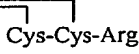
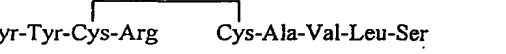
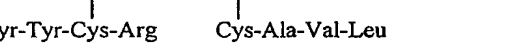
Fragment	MW <sub>calc</sub> (Da)	MW <sub>exp</sub> (Da)	Sequenz bestätigt
Glu-Glu-Gln-Ile-Gly-Lys	702.8	702.5	
<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>Cys-Leu-Pro-Lys      Cys-Ser-Thr-Arg</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Cys-Cys-Arg</p> </div> </div>	1301.5	1300.8	ja
<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>Ser-Cys-Leu-Pro-Lys      Cys-Ser-Thr-Arg</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Cys-Cys-Arg</p> </div> </div>	1388.6	1387.8	ja
<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>Tyr-Tyr-Cys-Arg      Cys-Ala-Val-Leu-Ser</p> </div> </div>	1093.3	1092.8	ja
<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>Tyr-Tyr-Cys-Arg      Cys-Ala-Val-Leu</p> </div> </div>	1006.2	1005.8	

Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse der massenspektrometrische Identifizierung der Peptidfragmente nach Proteolyse von hBD-3 mit Trypsin/Chymotrypsin.

#### Antimikrobielle Wirkung der Peptide gegen Bakterien und Hefen

Die antimikrobielle Aktivität der erfindungsgemäßen Peptide wurde unter Anwendung der Bestimmung der minimalen Inhibitionskonzentration (MIC) gegen human pathogene Gram-positive und Gram-negative Bakterien untersucht. Die minimale Hemmstoffkonzentration bezeichnet die Peptidkonzentration, die minimal erforderlich ist, um das Wachstum von Mikroorganismen nach einer Inkubationszeit von  $18 \pm 2$  h vollständig zu hemmen. Die minimale Inhibitionskonzentration wurde in Anlehnung an die von dem NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) herausgegebenen Empfehlungen (M7-A3) durchgeführt, wobei chemisch synthetisierte Peptide der Erfindung verwendet wurden. Die minimalen Hemmkonzentrationen sind in der nachfolgenden Tabelle in [ $\mu\text{g/ml}$ ] angegeben.



- 15 -

Folgende Peptide wurden getestet:

Peptide: 1: hBD-3 [Cys6-13/Cys18-36/Cys28-35]



2: hBD-3, linear:



3: hBD-3 (1-17) [Cys6-13]:



4: [Cys28,35(Acm)] hBD-3 (14-40), linear:



5: [Cys18,36(Acm)] hBD-3 (14-40) [Cys28-35]:



6: hBD-3 (14-40) [Cys18-36/28-35]:



Acm: Acetamidomethyl

Testmedium: ¼ konzentrierte Mueller Hinton Broth

Minimale Inhibitionskonzentrationen [µg/ml]:



- 16 -

Peptid :	1	2	3	4	5	6
<i>Enterococcus faecalis</i> (VRE)	75	37.5	>300	300	75	75
<i>Escherichia coli</i>	18.75	25	150	100	>300	200
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	100	50	>300	>300	>300	>300
<i>Staphylococcus aureus</i>	18.75	50	300	200	>300	150
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (Penicillin resistent)	18.75	37.5	100	18.75	>200	18.75
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100	50	>300	>300	>300	>300
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Patientenisolat)	100	75	>300	>300	>300	>300
<i>Burkholderia cepacia</i> (Patientenisolat)	37.5	nb	>300	nb	nb	nb

nb: nicht bestimmt

Die erfindungsgemässen Peptide inhibieren effektiv sowohl das Wachstum von Gram-positiven als auch von Gram-negativen Bakterien. Human pathogene Erreger, wie *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* und *Klebsiella pneumoniae* werden effektiv abgetötet. Auch das Wachstum von antibiotikaresistenten Keimen wie z. B. *Streptococcus pneumoniae* (Penicillin Resistenz), *Enterococcus faecalis* (Vancomycin Resistenz) und *Burkholderia cepacia* (multiresistent) wird von den erfindungsgemässen Peptiden effektiv inhibiert.

#### Test der erfindungsgemässen Peptide auf hämolytische Aktivität:

Die Fähigkeit antimikrobieller Peptide, sich an Plasmamembranen anzulagern und diese zu permeabilisieren, wird in vielen Fällen als Wirkmechanismus dieser Substanzen angesehen. Es ist wünschenswert, dass bakterielle



- 17 -

Membranen selektiv geschädigt werden, wohingegen die Zellen des Wirtes unbeeinflusst bleiben sollten. Als einfaches Modell zur Untersuchung der zytotoxischen Wirkung eines Peptids auf eukaryotische Zellen wird der Hämolysetest genutzt.

Die Untersuchung der hämolytischen Aktivität der erfindungsgemäßen Peptide wurde in Anlehnung an Helmerhorst *et al.* (Helmerhorst *et al.*, 1999, FEBS Lett. 449: 105-110) durchgeführt. Erythrozyten wurden aus dem citrathaltigen Vollblut eines gesunden Probanden durch Zentrifugation (1500 × g, 20 °C, 10 min) isoliert und mit Testmedium 200-fach verdünnt. Verschiedene Konzentrationen hBD-3 [Cys6-13/Cys18-36/Cys28-35] wurden in einer 96-Well-Mikrotiterplatte mit V-förmig zulaufendem Boden vorgelegt und für 1 h bei 37 °C mit der verdünnten Erythrozytensuspension inkubiert. Durch anschließende Zentrifugation (1000 × g für 5 min) wurden die Erythrozyten abgetrennt. Die durch freigesetztes Hämoglobin gefärbten Überstände wurden in eine 96-Well-Mikrotiterplatte mit flachem Boden überführt und ihre Absorption bei einer Wellenlänge von  $\lambda=450$  nm im Mikrotiterplatten-Leser bestimmt. Als Referenzwert für 100 %ige Hämolyse diente die Inkubation mit einer 1 %igen Lösung des Detergenz Tween-20. Nur mit Testmedium inkubierte Erythrozyten dienten als Negativkontrolle. Die Angabe der hämolytischen Aktivität von hBD-3 [Cys6-13/Cys18-36/Cys28-35] erfolgte in Bezug auf die totale Hämolyse mit Tween-20 und wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Hämolyse [\%]} = \frac{[A_{450 \text{ nm}} (\text{Peptid}) - A_{450 \text{ nm}} (\text{Negativkontrolle})]}{[A_{450 \text{ nm}} (1\% \text{ Tween 20}) - A_{450 \text{ nm}} (\text{Negativkontrolle})]} \cdot 100$$

Als Testmedium diente TSB-Medium mit 287 mM Glukose. Die isotonische Glukosekonzentration soll einer unspezifischen Hämolyse im hypotonen Milieu vorbeugen (Osmoprotektion).

Die Ergebnisse sind in Figur 12 aufgeführt. Das Peptid hBD-3 [Cys6-13/Cys18-36/Cys28-35] weist in antimikrobiell wirksamen Konzentrationen keine nennenswerte hämolytische Aktivität auf.



Effekt von hBD-3 auf Effektoren der Apoptose:

Es wurde mit der Methode der "DNA-Microarray-Hybridisierung", welche die Detektion durch einen bestimmten Faktor hoch- oder herunterregulierter Gene erlaubt, untersucht, ob hBD-3 eine Rolle bei der Auslösung der Apoptose zukommt. Dabei stimuliert man eine Zelllinie bzw. Primärzellen mit dem zu untersuchenden Faktor und lässt eine Kontrollprobe unstimuliert. Aus beiden Proben wird die Botenribonucleinsäure mRNA isoliert und in Gegenwart zweier fluoreszenzmarkierter Nucleotide (Cy-3 für die stimulierte Probe, Cy-5 für die Kontrolle) in cDNA-Erststrang ("Copy-Desoxyribonucleinsäure") umgeschrieben. Werden nun durch den zu untersuchenden Faktor Gene hochreguliert, so sind deren Transkripte in der stimulierten Probe verglichen mit der Kontrollprobe überrepräsentiert. Umgekehrt sind die Transkripte bei einer Herunterregulation unterrepräsentiert. Diese Verhältnisse spiegeln sich entsprechend in den markierten cDNAs wieder. Nun werden die markierten cDNAs aus stimulierten und unstimulierten Zellen in einem Ansatz mit punktförmig auf einem geeigneten Träger geordnet aufgetragenen DNA-Proben ("Spots") einer Vielzahl (mehrere Tausend) unterschiedlicher Gene "hybridisiert", wobei die cDNAs jeweils an den Spots der ihnen entsprechenden Gene "hängenbleiben". Die anschließend mit einem speziellen "Analyzer" detektierbaren Signalstärken sind proportional zu den Mengen mit den jeweiligen Spots hybridisierter cDNAs. Daher können durch den Vergleich des Hybridisierungsergebnisses aus der stimulierten mit dem der unstimulierten Probe (durch die unterschiedlichen Markierungen Cy-3 und Cy-5 unterscheidbar) alle die Gene detektiert werden, die durch den untersuchten Faktor in ihrer Aktivität beeinflusst wurden. Verwendet wurde ein von der Firma "NEN" (Boston, MA, USA) bezogener Array, der DNA-Proben von insgesamt 2400 Genen enthielt.

Humane Skelettmuskelzellen (SKMC 6723, bezogen von Bio Whittaker, Walkerswill, MD, USA) wurden mit 50 µg hBD-3 pro ml Medium für 90 Minuten stimuliert. Eine Kontrollprobe blieb unstimuliert. Anschließend wurde nach Standardverfahren die mRNA aus stimulierter Probe und Kontrolle isoliert und



- 19 -

in Gegenwart von Cy-3- (stimulierte Probe) bzw. Cy-5-markierten (Kontrolle) Nucleotiden in cDNA-Erststrang umgeschrieben. Beide cDNAs wurden vereint und gemeinsam mit den DNA-Spots auf dem Array von NEN entsprechend den Herstellerangaben hybridisiert. Der Array wurde anschließend zu Auswertung an NEN gesendet.

Es zeigte sich, dass das Gen für den Apoptose-Effektor Apaf-1 in den hBD-3-stimulierten Zellen um den Faktor 3,4 höher exprimiert wurde als in der Kontrolle. hBD-3 stellt damit einen Aktivator des Gens für Apaf-1 dar.

#### Einleitung der Apoptose bei Melanomzellen durch hBD-3:

Um den Einfluss von hBD-3 auf die Induktion der Apoptose zu untersuchen, wurde die humane Melanomzelllinie SKMEL-28 verwendet. Der Apoptose-Nachweis erfolgte mit Hilfe eines spezifischen ELISA der Firma Roche (Mannheim) ("Cell Death Detection ELISA", Best. Nr. 1 544 675). Das Prinzip dieses ELISAs beruht auf dem Nachweis Apoptose-typischer fragmentierter DNA (Zhang JH, Xu M (2000). DNA fragmentation in apoptosis. Cell Res. 10: 205-211) und daran gebundener Histone. Hierzu werden spezielle Mikrotiter-Module mit monoklonalen, gegen Histone gerichteten Maus-Antikörpern beschichtet. Anschließend wird zu testendes Zelllysate zugegeben und fragmentierte, Histon-assoziierte DNA - soweit vorhanden - bindet an die Antikörper. Nach entsprechenden Waschschritten wird ein zweiter, gegen DNA gerichteter monoklonaler Maus-Antikörper zugegeben, der mit einer Peroxidase konjugiert ist. Die Menge an bindenden Antikörpern ist dabei innerhalb eines bestimmten Bereiches proportional zur Menge im ursprünglichen Zelllysate vorhandener fragmentierter DNA. Diese kann nach erneuten Waschschritten indirekt durch die Peroxidase-katalysierte Bildung einer im Bereich von 405 nm absorbierenden Substanz aus dem Substrat ABTS (2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazolin-sulfonat]) erfasst werden (Messung am Spektralphotometer). Zum Nachweis der hBD-3-induzierten Apoptose wurden konkret in "Sechs-Well-Kulturplatten" (2,2 ml Medium je Vertiefung) SKMEL-28 Zellen kultiviert und noch in der exponentiellen Wachstumsphase auf  $10^5$  Zellen pro ml sowie auf unterschiedliche Konzentrationen an hBD-3



- 20 -

eingestellt (0, 1, 3, 10, 30, 100 µg/ml). Nach fünf Stunden Inkubation wurden die Zellen entsprechend des Herstellerprotokolls weiterbehandelt und schließlich eingetretene Apoptosen indirekt durch die Peroxidase katalysierte Farbreaktion am Photometer bestimmt.

Die Auswertung von drei unabhängigen Versuchen ergab, dass bereits bei hBD-3-Konzentrationen ab 10 µg/ml eine signifikante Erhöhung der Absorption gegenüber der Nullkontrolle zu verzeichnen war. Sie betrug rund 2,0 A<sub>405</sub>E (Absorptionseinheiten bei 405 nm), während die Absorption bei der Nullkontrolle niedriger als 0,2 A<sub>405</sub>E war. Erhöhte hBD-3 Konzentrationen von 30 und 100 µg/ml führten zu keiner zusätzlichen Absorptionserhöhung. Damit wird eine Einleitung der Apoptose in der humanen Melanomzelllinie SKMEL-28 durch hBD-3 in Konzentrationen ab 10 µg/ml gezeigt.

Um die Versuchsergebnisse in einem zweiten unabhängigen Experiment zu verifizieren, wurden SKMEL-28 Zellen in 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen mit einem Volumen von 20 ml Medium kultiviert und noch innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase entsprechend den oben genannten Bedingungen mit 10 µg/ml hBD-3 behandelt. Die DNA der Zellen wurde anschließend nach Standardprotokollen isoliert, komplett auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und nach Ethidiumbromid-Färbung unter UV-Durchlicht sichtbar gemacht. Auch hier zeigte sich das für in die Apoptose übergegangene Zellen typische Muster einer Leiter genomischer DNA-Fragmente, deren Größen Vielfache von ca. 180 Bp darstellten (zur Übersicht siehe Zhang und Xu, 2000). Die DNA der unbehandelten Zellen befand sich wie für undegradierete DNA erwartet hingegen im hochmolekularen Bereich.

Die ermittelten Daten belegen eine Apoptose-auslösende Wirkung von hBD-3 in Melanomzelllinien bereits ab Konzentrationen von 10 µg pro ml Kulturmedium. Daher ist hBD-3 als Therapeutikum für die Behandlung von Melanomen und andere Krebsarten einsetzbar.



Figuren:Figur 1:

Analytische HPLC von hBD-3.

*Säule:* Vydac C18, 4.6×250 mm, 5 µm, 300 Å

*Flussrate:* 0.8 mL/min

*Eluent A:* 0.07% Trifluoressigsäure

*Eluent B:* 0.07% Trifluoressigsäure in Acetonitril/Wasser 80:20

*Gradient:* 0 – 5 min: 10 % B, 5 – 35 min: 2 % B/min

Figur 2:

Kapillarzonenoelektrophorese von hBD-3.

*System:* Biofocus 3000 (Bio-Rad)

*Kapillare:* fused silica capillary, 30 cm×50 µm, unbeschichtet

*Puffersystem:* 0.1 M Phosphatpuffer mit Polymer modifier, pH 2.5

*Messparameter:* konstante Spannung 120 kV; UV-Detektion bei 200 nm

Figur 3:

Massenspektrometrische Analyse von hBD-3.

*(Elektrospray-Massenspektrometrie, Perkin-Elmer Sciex API III)*

Figur 4:

HPLC-Analyse der proteolytischen Zersetzung von hBD-3 mit Trypsin/Chymotrypsin mit Zuordnung der identifizierten Fragmente.

*Säule:* Vydac C18, 4.6×250 mm, 5 µm, 300 Å

*Flussrate:* 0.8 mL/min

*Eluent A:* 0.07% Trifluoressigsäure

*Eluent B:* 0.07% Trifluoressigsäure in Acetonitril/Wasser 80:20

*Gradient:* 0 – 5 min: 10 % B, 5 – 35 min: 2 % B/min

Figur 5:

Analytische HPLC von hBD-3 (1-17).

*Säule:* Vydac C18, 4.6×250 mm, 5 µm, 300 Å

*Flussrate:* 0.8 mL/min

*Eluent A:* 0.07% Trifluoressigsäure

*Eluent B:* 0.07% Trifluoressigsäure in Acetonitril/Wasser 80:20

*Gradient:* 0 – 5 min: 10 % B, 5 – 35 min: 2 % B/min

Figur 6:

Kapillarzonenoelektrophorese von hBD-3 (1-17).

*System:* Biofocus 3000 (Bio-Rad)

*Kapillare:* fused silica capillary, 30 cm×50 µm, unbeschichtet

*Puffersystem:* 0.1 M Phosphatpuffer mit Polymer modifier, pH 2.5

*Messparameter:* konstante Spannung 120 kV; UV-Detektion bei 200 nm



Figur 7:

Massenspektrometrische Analyse von hBD-3 (1-17).

*(Elektrospray-Massenspektrometrie, Perkin-Elmer Sciex API III)*

Figur 8:

Analytische HPLC von hBD-3 (14-40) [Cys18-36/Cys28-35].

*Säule:* Vydac C18, 4.6x250 mm, 5 µm, 300 Å

*Flussrate:* 0.8 mL/min

*Eluent A:* 0.07% Trifluoressigsäure

*Eluent B:* 0.07% Trifluoressigsäure in Acetonitril/Wasser 80:20

*Gradient:* 0 – 5 min: 10 % B, 5 – 35 min: 2 % B/min

Figur 9:

Kapillarzonenoelektrophorese von hBD-3 (14-40) [Cys18-36/Cys28-35].

*System:* Biofocus 3000 (Bio-Rad)

*Kapillare:* fused silica capillary, 30 cmx50 µm, unbeschichtet

*Puffersystem:* 0.1 M Phosphatpuffer mit Polymer modifier, pH 2.5

*Messparameter:* konstante Spannung 120 kV; UV-Detektion bei 200 nm

Figur 10:

Massenspektrometrische Analyse von hBD-3 (14-40) [Cys18-36/Cys28-35].

*(Elektrospray-Massenspektrometrie, Perkin-Elmer Sciex API III)*

Figur 11:

Vergleich der Peptidfragmente Ser-Cys-Leu-Pro-Lys-Glu-Glu-Gln-Ile-Gly-Lys-Cys-Ser-Thr-Arg-Gly-Arg-Lys-Cys-Cys-Arg-Arg-Lys-Lys nach proteolytischer Zersetzung von hBD-3 bzw. hBD-3 (14-40) [Cys18-36/Cys28-35] mit Chymotrypsin (pH 8, 4 h) durch Kapillarzonenoelektrophorese;  
a – Peptidfragment aus hBD-3; b – Peptidfragment aus hBD-3 (14-40) [Cys18-36/Cys28-35]; c – Komigration beider Fragmente.

*System:* Biofocus 3000 (Bio-Rad)

*Kapillare:* fused silica capillary, 30 cmx50 µm, unbeschichtet

*Puffersystem:* 0.1 M Phosphatpuffer mit Polymer modifier, pH 2.5

*Messparameter:* konstante Spannung 120 kV; UV-Detektion bei 200 nm.

Figur 12: Hämolytische Aktivität von hBD-3 [Cys6-13/Cys18-36/Cys28-35].

Die hämolytische Aktivität von hBD-3 [Cys6-13/Cys18-36/Cys28-35] wurde über die Freisetzung von Hämoglobin aus Erythrozyten bestimmt, die spektralphotometrisch quantifizierbar ist. Als Positivkontrolle diente das antimikrobiell wirksame, hämolytisch aktive Peptid MBI-28 (Piers *et al.*, 1994, Antimicrob. Agents Chemother. 38: 2311-2316).



**Patentansprüche**

1. Humanes beta-Defensin-3 (hBD-3) mit der Aminosäuresequenz Seq. No. 1:

Z<sub>1</sub>-Cys-Arg-Val-Arg-Gly-Gly-Arg-Cys-Ala-Val-Leu-Ser-Cys-Leu-Pro-Lys-Glu-Glu-Gln-Ile-Gly-Lys-Cys-Ser-Thr-Arg-Gly-Arg-Lys-Cys-Cys-X<sub>1</sub>,

wobei Z<sub>1</sub> und X<sub>1</sub> Aminosäuren oder Polypeptide aus 1 bis 50 Aminosäuren darstellen, sowie deren natürliche, synthetische und pharmakologisch verträgliche Derivate, insbesondere amidierte, acylierte, phosphorylierte, glycosylierte und zyklische Derivate, sowie deren durch Aminosäuresubstitution, -deletion oder -insertion entstandene Derivate und Fragmente mit biologischer Wirkung, die aus der Aminosäuresequenz abgeleitet werden.

2. hBD-3 nach Anspruch 1, das eine der Sequenzen Seq. No. 2:

Leu-Gln-Lys-Tyr-Tyr-Cys-Arg-Val-Arg-Gly-Gly-Arg-Cys-Ala-Val-Leu-Ser-Cys-Leu-Pro-Lys-Glu-Glu-Gln-Ile-Gly-Lys-Cys-Ser-Thr-Arg-Gly-Arg-Lys-Cys-Cys-Arg-Arg-Lys-Lys

Seq. No. 3:

Gly-Ile-Ile-Asn-Thr-Leu-Gln-Lys-Tyr-Tyr-Cys-Arg-Val-Arg-Gly-Gly-Arg-Cys-Ala-Val-Leu-Ser-Cys-Leu-Pro-Lys-Glu-Glu-Gln-Ile-Gly-Lys-Cys-Ser-Thr-Arg-Gly-Arg-Lys-Cys-Cys-Arg-Arg-Lys-Lys

oder Seq No. 4:

Met-Arg-Ile-His-Tyr-Leu-Leu-Phe-Ala-Leu-Leu-Phe-Leu-Phe-Leu-Val-Pro-Val-Pro-Gly-His-Gly-Gly-Ile-Ile-Asn-Thr-Leu-Gln-Lys-Tyr-Tyr-Cys-Arg-Val-Arg-Gly-Gly-Arg-Cys-Ala-Val-Leu-Ser-Cys-Leu-Pro-Lys-Glu-Glu-Gln-Ile-Gly-Lys-Cys-Ser-Thr-Arg-Gly-Arg-Lys-Cys-Cys-Arg-Arg-Lys-Lys

aufweist.

3. hBD-3-Fragmente mit einer der Aminosäuresequenzen Seq. No. 5:



- 24 -

$Z_1$ -Cys-Arg-Val-Arg-Gly-Gly-Arg-Cys- $X_2$

oder Seq. No. 6:

$Z_2$ -Cys-Leu-Pro-Lys-Glu-Glu-Gln-Ile-Gly-Lys-Cys-Ser-Thr-Arg-Gly-Arg-  
Lys-Cys-Cys- $X_1$

wobei  $Z_1$ ,  $Z_2$ ,  $X_1$  und  $X_2$  Aminosäuren oder Polypeptide aus 1 bis 50 Aminosäuren darstellen, sowie deren synthetische und pharmakologisch verträgliche Derivate, insbesondere zyklische, amidierte, acylierte, phosphorylierte und glycosylierte Derivate, sowie deren durch Aminosäuresubstitution, -deletion oder -insertion entstandene Derivate und Fragmente mit biologischer Wirkung, die aus der Aminosäuresequenz abgeleitet werden.

4. hBD-3-Fragmente nach Anspruch 3, die eine der Sequenzen Seq. No. 7:

Leu-Gln-Lys-Tyr-Tyr-Cys-Arg-Val-Arg-Gly-Gly-Arg-Cys-Ala-Val-Leu-Ser

oder Seq. No. 8:

Gly-Ile-Ile-Asn-Thr-Leu-Gln-Lys-Tyr-Tyr-Cys-Arg-Val-Arg-Gly-Gly-Arg-  
Cys-Ala-Val-Leu-Ser

oder Seq. No. 9:

Ala-Val-Leu-Ser-Cys-Leu-Pro-Lys-Glu-Glu-Gln-Ile-Gly-Lys-Cys-Ser-Thr-  
Arg-Gly-Arg-Lys-Cys-Cys-Arg-Arg-Lys-Lys

aufweisen.

5. Derivate oder Fragmente des hBD-3 nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass einzelne Aminosäuren so ausgetauscht wurden, dass das Peptid insgesamt eine höhere positive Ladung aufweist.
6. Derivate oder Fragmente des hBD-3 nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass eines der vier Glycine aus Sequenz No. 1 und/oder das Alanin, das in Sequenz No. 1 auf Cystein 2 folgt und/oder das Leucin oder Prolin, die in der Sequenz No. 1 auf Cystein 3 folgen gegen basische oder aromatische Aminosäuren substituiert sind, wobei bei Fragmenten



- 25 -

des hBD-3 die entsprechenden zur Sequenz No. 1 homologen Aminosäuren substituiert sind.

7. hBD-3 oder hBD-3-Fragmente oder Derivate nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass diese eine Cysteinbrücke zwischen Cystein 1 und Cystein 2, eine Cysteinbrücke zwischen Cystein 3 und Cystein 6 und/oder eine Cysteinbrücke zwischen Cystein 4 und Cystein 5 enthalten, wobei die Nummern 1 bis 6 den sechs Cysteinen oder den zu ihnen homologen Cysteinen entsprechen, die in der Sequenz in Anspruch 1 vom N- zum C- Terminus hin enthalten sind.
8. hBD-3 oder Derivate von hBD-3 nach einem der Ansprüche 1, 2, 5 oder 6 oder Fragmente der Sequenz 6 nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass
  - Cystein 3 und Cystein 6 keine Cysteinbrücken ausbilden und Cystein 4 und Cystein 5 eine Cysteinbrücke ausbilden, oder
  - Cystein 3 und Cystein 6 eine Cysteinbrücke ausbilden und Cystein 4 und Cystein 5 keine Cysteinbrücke ausbilden, oder
  - keine Cysteinbrücke ausgebildet ist, oder
  - Cystein 3 und Cystein 6 eine Cysteinbrücke ausbilden und Cystein 4 und Cystein 5 eine Cysteinbrücke ausbilden.
9. Verfahren zur Herstellung von hBD-3 oder Derivaten oder Fragmenten von hBD-3 nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass das hBD-3 oder hBD-3-Fragmente oder Derivate durch Festphasen- und/oder Flüssigphasen-Synthese aus den geschützten Aminosäuren, die in der enthalten sind, hergestellt werden, deblockiert werden, und durch Chromatographie aufgereinigt werden.
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass Cysteinbrücken durch Oxidation eingeführt werden, wobei gegebenenfalls eine gezielte Einführung der Cysteinbrücken durch Verwendung von Schutzgruppen an nicht zu verknüpfenden Cysteinen erfolgt.



- 26 -

11. Verfahren zur Herstellung von hBD-3 oder Derivaten oder Fragmenten von hBD-3 nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass dieses in prokaryontischen oder eukaryontischen Zellen exprimiert und chromatographisch gereinigt wird.
12. Verfahren zur Herstellung des hBD-3 oder seiner Derivate oder Fragmente nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass es aus Körperflüssigkeiten, insbesondere Blut, Hemodialysat oder Hemofiltrat über Chromatographie-Verfahren isoliert wird.
13. Nucleinsäuren, kodierend für hBD-3 oder seine Derivate oder Fragmente nach einem der Ansprüche 1 bis 8.
14. Vektoren oder Plasmide, enthaltend Nucleinsäuren nach Anspruch 13.
15. Arzneimittel, enthaltend hBD-3 oder Derivate oder Fragmente von hBD-3 nach einem der Ansprüche 1 bis 8, Nucleinsäuren nach Anspruch 13 oder Vektoren oder Plasmide nach Anspruch 14.
16. Diagnostikmittel, enthaltend hBD-3 oder Derivate oder Fragmente von hBD-3 nach einem der Ansprüche 1 bis 6, Nucleinsäuren nach Anspruch 13 oder Vektoren oder Plasmide nach Anspruch 14.
17. Verwendung von hBD-3 oder Derivaten oder Fragmenten von hBD-3 nach einem der Ansprüche 1 bis 8, von Nucleinsäuren nach Anspruch 13 oder Vektoren oder Plasmiden nach Anspruch 14 zur Herstellung eines Arzneimittels zur antimikrobiellen Behandlung, zur Abwehr und Bekämpfung von pathogenen Keimen, zur Behandlung von Erkrankungen der Atemwege, insbesondere die durch Infektionen mit den Bakterien *Burkholderia cepacia* und *Pseudomonas aeruginosa* ausgelöst oder verstärkt werden, zur Behandlung der cystischen Fibrose, zur Behandlung entzündlicher Krankheiten des Magen-Darm-Traktes, des Urogenitaltraktes, bei Sepsis, bei gastrointestinalen Infektionen, insbesondere durch *Helicobacter pylori* ausgelöst, zur Behandlung und Abwehr von gram-positiven und gram-negativen Bakterien, Hefen, *Helicobacter pylori*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella*

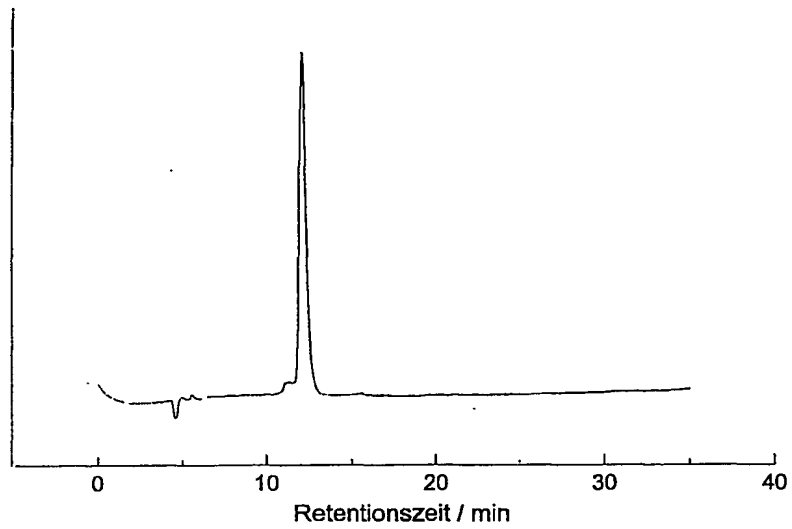
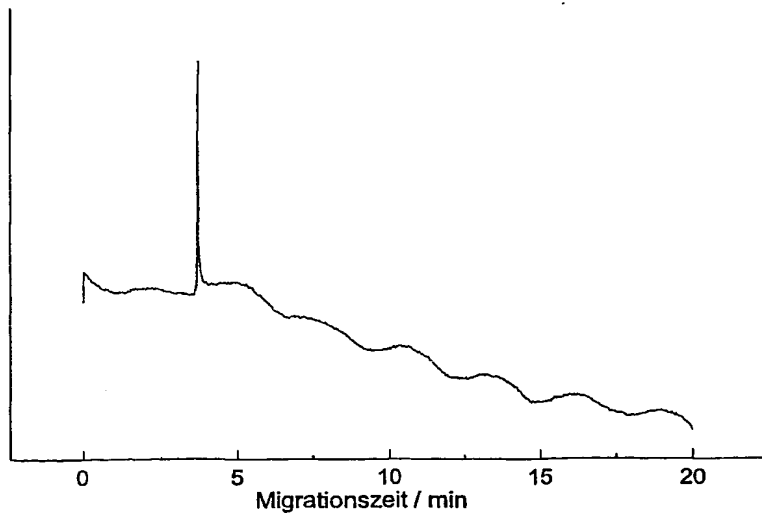


- 27 -

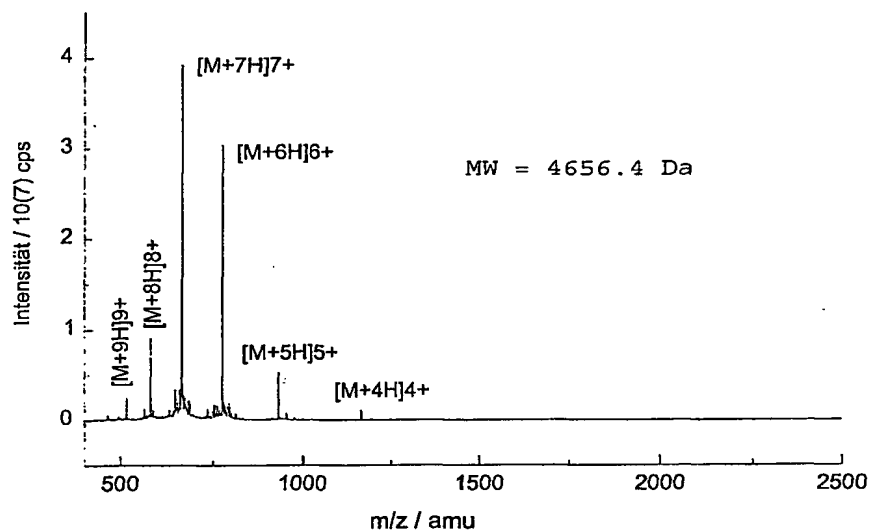
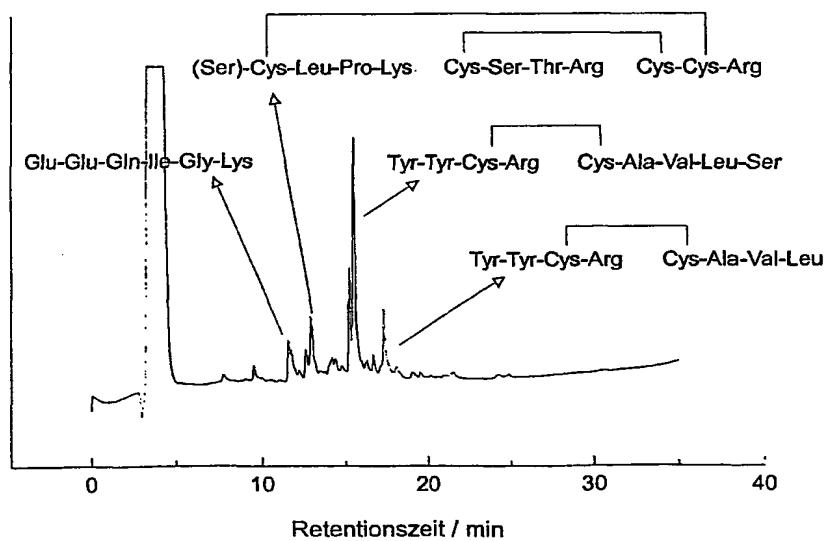
pneumoniae, Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa oder Burkholderia cepacia, zur Auslösung der Apoptose, zur Behandlung maligner Melanome und von Tumoren.

18. Verwendung von hBD-3 oder Derivaten und Fragmenten von hBD-3 nach Anspruch 17 in galenischen Applikationsformen, insbesondere lyophilisiert und in Mannit aufgenommen in sterilen Ampullen zur Auflösung in Kochsalzlösung und/oder Infusionslösungen und Inhalationslösungen, und/oder in Kombination mit anderen antibiotischen Wirkstoffen.

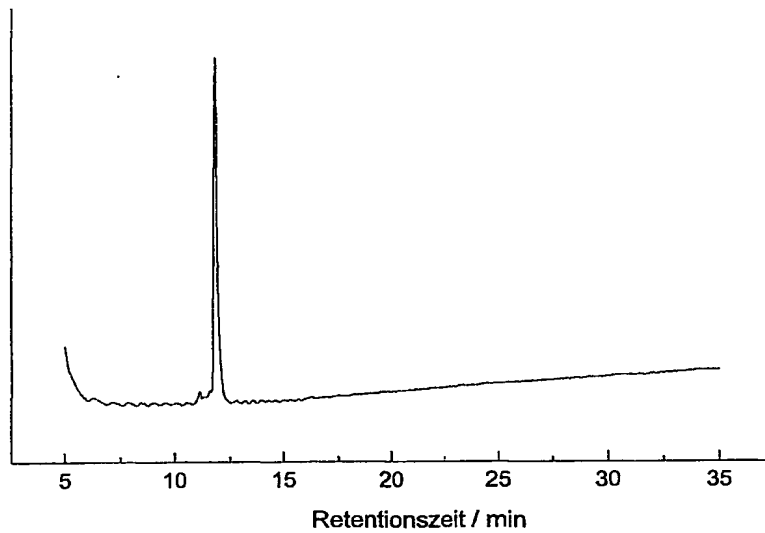
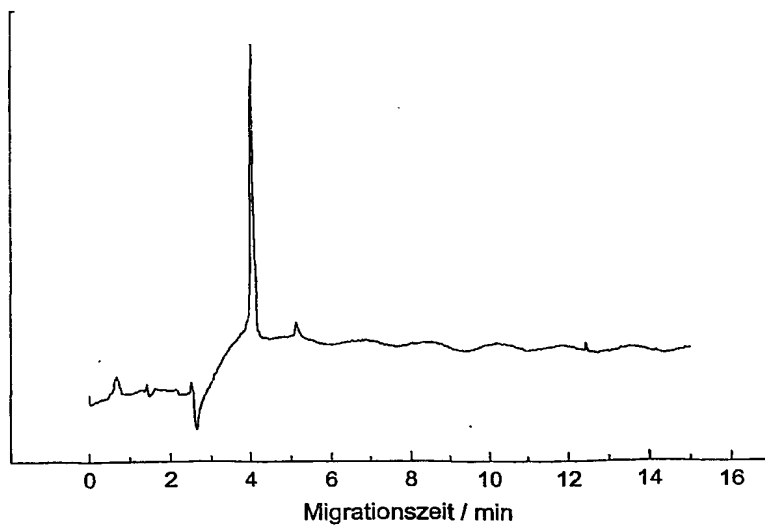


**Figur 1****Figur 2**

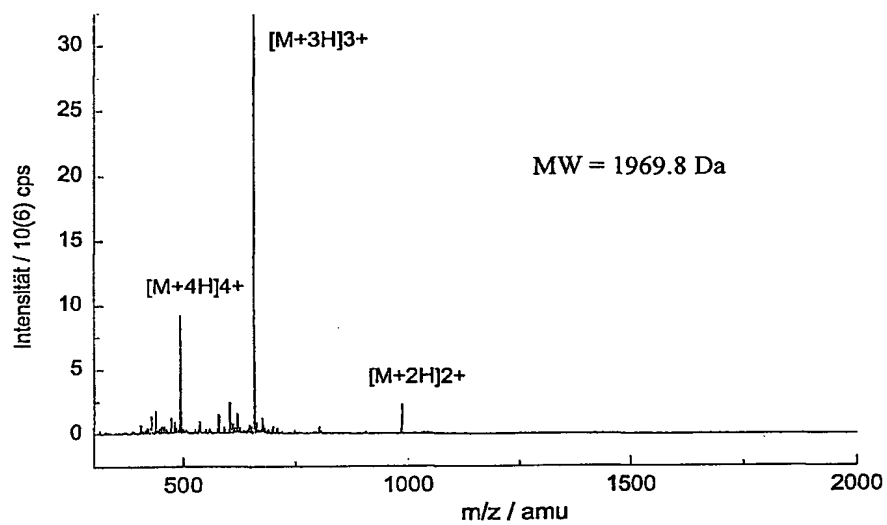
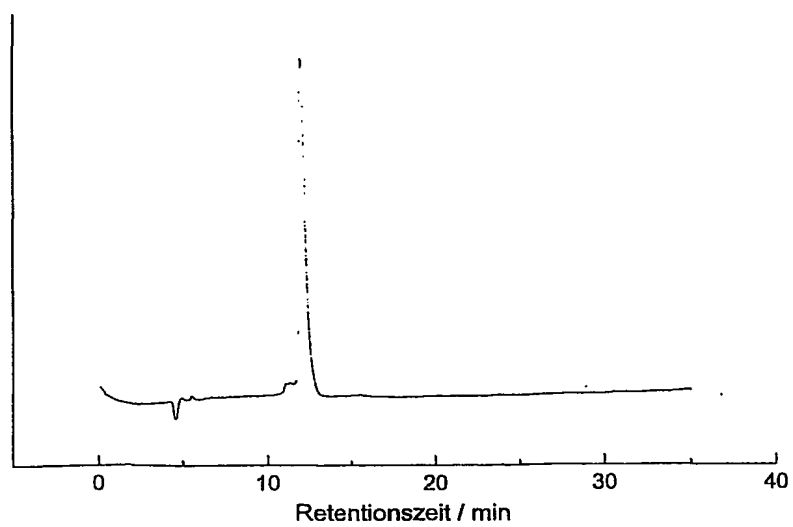


**Figur 3****Figur 4**

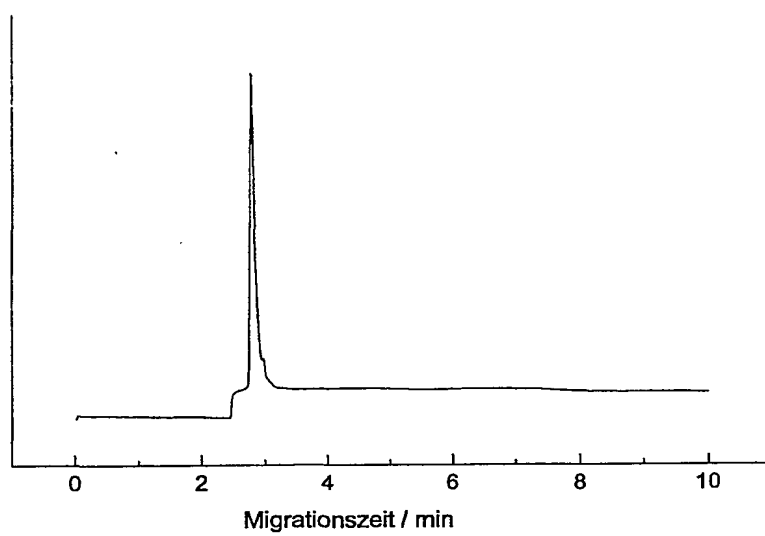
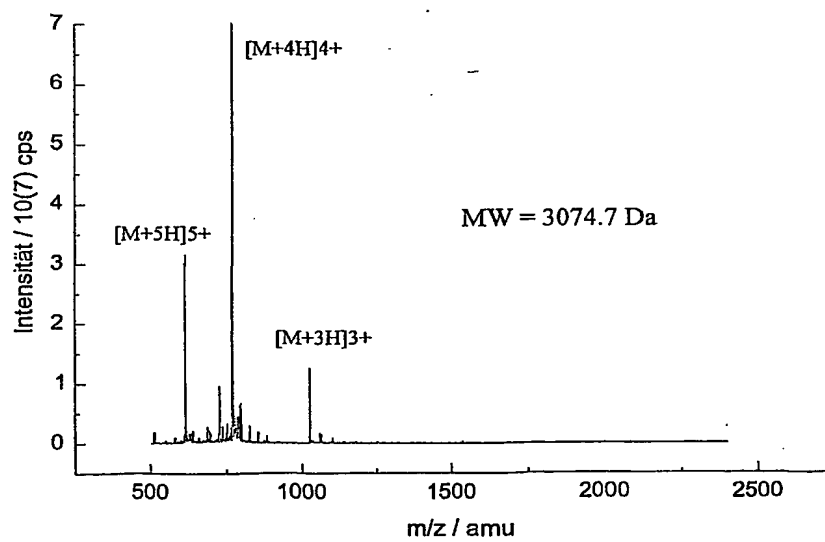


**Figur 5****Figur 6**

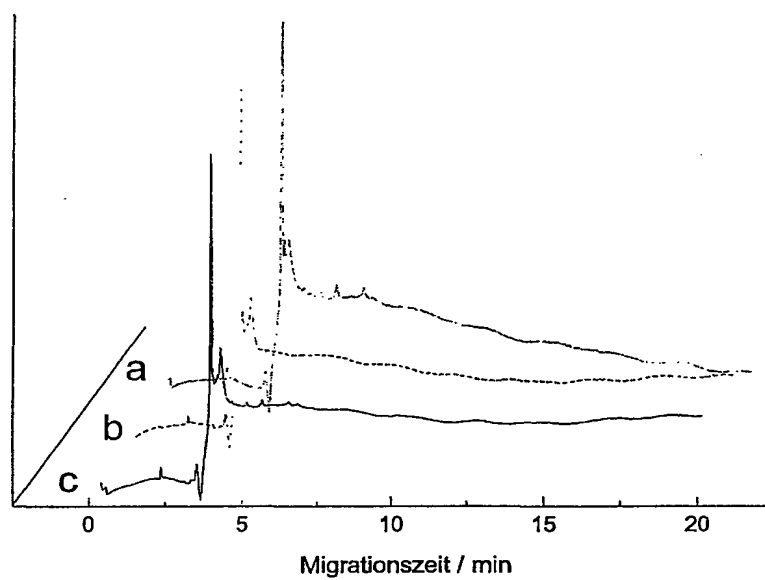


**Figur 7****Figur 8**



**Figur 9****Figur 10**



**Figur 11**



**Figur 12:**